



Patent  
Attorney Docket No. 021679-093

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Sunghoon KIM

Application No.: 10/623,567

Filing Date: July 22, 2003

Title: METHOD FOR STIMULATING WOUND HEALING

Group Art Unit: Unassigned

Examiner: Unassigned

Confirmation No.: Unassigned

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: Korea

Patent Application No(s): 10-2002-0042858

Filed: July 22, 2002

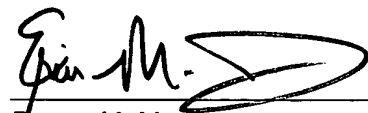
In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

Date: December 8, 2003

By  #51,147  
for: Donna M. Meuth  
Registration No. 36,607



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0042858  
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 07월 22일  
Date of Application JUL 22, 2002

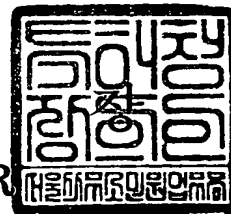
출원인 : 재단법인서울대학교산학협력재단  
Applicant(s) Seoul National University Industry Foundation



2003      년      09      월      08      일

특      허      청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

**【서류명】** 특허출원서  
**【권리구분】** 특허  
**【수신처】** 특허청장  
**【제출일자】** 2002.07.22  
**【발명의 명칭】** p 43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물  
**【발명의 영문명칭】** Pharmaceutical composition for wound treatment containing p43 as an effective component  
**【출원인】**  
**【명칭】** 대한민국 (서울대학교 총장)  
**【출원인코드】** 2-2000-047513-2  
**【대리인】**  
**【성명】** 김석현  
**【대리인코드】** 9-1998-000634-1  
**【포괄위임등록번호】** 2002-054274-7  
**【대리인】**  
**【성명】** 황주명  
**【대리인코드】** 9-1998-000597-5  
**【포괄위임등록번호】** 2002-054275-4  
**【발명자】**  
**【성명】** 김성훈  
**【출원인코드】** 4-1998-036485-5  
**【심사청구】** 청구  
**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**  
**【서열개수】** 7  
**【서열목록의 전자파일】** 첨부  
**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 김석현 (인) 대리인  
 황주명 (인)  
**【수수료】**  
**【기본출원료】** 20 면 29,000 원  
**【가산출원료】** 17 면 17,000 원  
**【우선권주장료】** 0 건 0 원  
**【심사청구료】** 4 항 237,000 원

1020020042858

출력 일자: 2003/9/17

【합계】	283,000 원
【면제사유】	국가
【면제후 수수료】	0 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 외용제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 창상 치료용 약학적 조성물은 그 유효성분인 p43 단백질에 의한 대식세포/단핵세포 및 내피세포의 유도, 재생피화, 혈관신생 등과 같은 작용에 의하여 창상 치유에 탁월한 효과를 나타내기 때문에, 우수한 창상 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

**【대표도】**

도 4

**【색인어】**

p43, 혈관신생, 창상 치유

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물 {Pharmaceutical composition for wound treatment containing p43 as an effective component}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 p43 돌연변이체 대립 유전자(allele) 내에서 진 트랩(gene trap)이 삽입된 위치를 나타내는 모식도로서, A, K, S 및 H는 각각 *Apa* I, *Kpn* I, *Sac* I 및 *Hind*III의 제한 효소 위치(restriction site)를 나타낸다.

IF3, IR3 및 pKOF2 : PCR을 위한 프라이머

도 2는 p43 돌연변이를 확인하기 위해 써던 블롯(A) 및 PCR(B)을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

+/+ : 야생형 마우스(WT)

+/- : 이형접합성 돌연변이체 마우스

-/- : 동형접합성 돌연변이체 마우스(Ho)

도 3은 p43의 발현을 조사하기 위해 노던 블롯(A) 및 웨스턴 블롯(B)을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

+/+ : 야생형 마우스(WT)

+/- : 이형접합성 돌연변이체 마우스

-/- : 동형접합성 돌연변이체 마우스(Ho)

도 4는 시간에 따른 창상 치유 정도를 관찰한 사진(A) 및 창상 치유 정도를 초기 창상 면적(wound area)에 대한 퍼센트로 계산하여 나타낸 막대 그래프(B)이다.

Ho: 동형접합성 돌연변이체 마우스

WT: p43을 처리하지 않은 야생형 마우스(대조구)

WT+p43: p43을 처리한 야생형 마우스

도 5는 p43의 창상 치유 촉진효과를 조사하기 위해, 조직 화학적 분석(histochemical analysis)을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

화살표: 자라나는 상피층(advancing epithelial layer)

보라색 부분: 육아 조직(granulation tissue)

도 6은 대식세포/단핵세포 및 내피세포의 생성 정도를 면역염색(immunostaining)을 이용하여 조사한 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 혈관 생성에 있어서 p43의 효과를 조사한 창상 이동 분석(wound migration assay; A), 혈관 형성(tube formation) 조사(B) 및 CAM 어세이(C)를 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 8은 p43이 신혈관형성(neovascularization)을 촉진하는지 알아보기 위해, 매트릭스 젤 플러그 어세이(matrigel plug assay)를 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 9는 p43을 함유하는 매트릭스 젤 내의 헤모글로빈(Hb)의 함량을 조사하여 나타낸 그래프이다.

**【발명의 상세한 설명】****【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <22> 본 발명은 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 외용제에 관한 것이다.
- <23> 창상 치유(wound healing)는 손상에 대한 조직의 반응이며, 조직회복의 과정으로 화학주성(chemotaxis), 세포의 분화(cell differentiation) 및 복제(replication), 기질 단백질(matrix protein)의 합성, 혈관신생, 창상의 재구성 등을 포함하는 복잡한 생물학적 과정으로 알려져 있다(Steed, D.L. *et al.*, *Clin. Plast. Surg.* 25:397, 1998). 창상 치유 과정을 조절하는 대표적인 물질 중의 하나로 성장 인자(growth factor)들을 들 수 있는데, 이들은 창상 치유 과정 전반에 걸쳐 세포의 성장, 분화, 대사 등을 조절하고 창상 주변 환경 또한 조절하므로, 이를 이용한 치료제의 개발이 꾸준히 진행되고 있다. 이외에도 다양한 사이토카인(cytokine)들이 창상 치유에 관여한다고 알려져 있다. 예를 들면, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )가 있다. 상기 TGF- $\beta$ 는 여러 가지 세포들의 성장과 분화에 관여하는 물질로, 성장 조절, 면역반응의 조절, 골생성의 자극, 연골-특이적 고분자(cartilage-specific macromolecule)의 유도, 창상치유 촉진 등의 여러 가지 복잡한 기능을 한다고 보고된 바 있다(Bennett, N.T. *et al.*, *Am. J.Surg.* 165: 728, 1993).



<24> 창상은 피부결손의 유무에 의해 두 종류로 나눌 수 있으며, 또한 피부결손의 유무에 의해 치유기전이 다르다. 대부분의 경미한 상해에서와 같이, 피부결손을 수반하지 않는 창상의 경우, 예를 들면, 표피(epidermis)만이 손상된 경우에는 각질세포(keratinocyte)가 창상의 가장자리로부터 이동하여 결국 창상을 덮어서 표피 및 각질을 재형성시킨다(Knighton, D.R. and Fiegel, V.D., *Invest. Radiol* 26:604-611, 1991). 그러나, 피부의 모든 층이 손상되거나 파괴된 경우에는, 육아조직(granulation tissue)이라고 불리는 새로운 결합 조직(connective tissue)이 창상 공간을 충전함과 동시에 창상부위의 주위로부터 재생하여 오는 표피로 창상 부위가 덮여져야 한다. 상기 육아조직은 창상 공간 내로 이동하는 섬유아세포에 의한 세포외 매트릭스 성분(extracellular matrix component), 예를 들어 콜라겐(collagen)의 침착에 의해 형성된다. 이와 같이 창상의 치유기전은 피부결손의 유무에 의해 크게 다르다. 성공적인 창상 치유를 위해서는 창상치유의 전체 다단계 과정이 완료되어야만 한다. 창상 치유에 관계하는 성분들 중의 하나 또는 그 이상이 빠지면 치유는 일어나지 않으며, 피부는 복원되지 않고 창상은 노출된 채로 남게 된다. 이와 같이 노출된 창상은 쉽게 감염될 수 있게 되어 치유 과정을 더 지연시키고 피부 상에서 궤양(ulcer) 및 미란(erosion)의 형성을 야기시킬 수 있다. 따라서, 피부결손을 수반하는 창상에 있어서 육아조직의 증식 및 피부의 재생을 촉진시키는 약제의 개발이 요구되어 왔다.

<25> 한편, p43은 312개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서, 다중-tRNA 합성효소 복합체(multi-tRNA synthetase complex)에 결합하여 상기 다중-tRNA 합성효소의 촉매적 활성(catalytic activity)을 증진시키는 단백질이다. 상기 p43은 뇌척수염, 신경염 및 포도막염과 같은 실험상의 자가면역질환부위에 있는 미세신경세포에서 높은 수준으로 발현하는데, 이와 같이 특정 발생 단계 및 조직에서 p43의 발현 수준이 높게 나타나는 현상은 p43이 염증반응과 세

포 고사에 관여한다는 것을 암시한다(Berger, A. C. *et al.*, *J. Immunother.* 23:519-527, 2000). 본 발명자들은 p43이 효과적인 사이토카인 및 항암제로 이용될 수 있음을 이전 PCT 출원에서 밝힌 바 있다(제 PCT/KR00/00630호). 하지만, 아직까지 p43이 창상 치료용으로 사용될 수 있다는 것이 밝혀진 예는 없다. 본 발명자들은 상기 p43이 창상 치유과정인 염증 단계, 상피화 및 혈관형성 단계에 작용하여 창상 치유 과정을 촉진하는 신규한 활성을 갖는다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

#### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <26> 따라서, 본 발명의 목적은 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <27> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 외용제를 제공하는 것이다.

#### 【발명의 구성 및 작용】

- <28> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- <29> 또한, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 조성물을 함유하는 외용제를 제공한다.
- <30> 본 발명에서 '창상' 이란, 절창(incisions), 찰과상(excoriation), 수술 창상(surgical wound) 등의 외상(external wound)뿐만 아니라, 화상(burn), 궤양(ulcer), 욕창(bedsore), 수술 후 감염(infection after surgical operation) 또는 피부염(dermatitis) 등을 의미하는 것

이다. 상기 화상은 햇빛화상, 화학화상, 방사선화상 또는 열성화상일 수 있으며, 상기 궤양은 압박궤양(pressure ulcer), 반창고 궤양(Plaster ulcer) 또는 욕창성 궤양(decubitus ulcer) 등일 수 있다. 또한 상기 피부염은 농가진(impetigo), 간찰진(intertrigo), 모낭염(folliculitis) 또는 습진(eczema)일 수 있다.

<31> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<32> 피부가 손상을 입었을 때 손상 부위가 노출됨으로써 외부로부터 독소나 세균의 침입을 받게 되고, 이에 대한 신체의 방어 기능으로 염증이 유발된다. 따라서, 치료를 위해서는 손상 부위에 육아조직이 빨리 돌아나도록 조치하여야 함은 물론이고, 세균 감염이나 필요이상의 염증을 억제하는 일이 무엇보다도 중요하다. 그렇지 않으면 치유 기간이 연장될 뿐 아니라 큰 흉터가 남게 된다. 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 p43은 화상을 포함한 모든 창상과 궤양 부위에 육아조직이 빨리 돌아나게 하고 혈관형성을 촉진하여 창상을 빨리 아물게 하는데 뛰어난 효과가 있다. 본 발명에 따른 창상 치료용 약학적 조성물은 상기 p43을 유효성분으로 한다는 점에 특징이 있으며, 상기 p43은 상처부위 크기에 따라 적정량을 투여(또는 도포)할 수 있다. 예를 들면, 지름 0.5cm의 좌우대칭 원형 절제창의 경우 약 1ng 내지 5 $\mu$ g의 p43을 투여하는 것이 바람직하다.

<33> 본 발명의 일 실시예에서는 p43 구조 유전자 내에 돌연변이가 유발된 마우스를 제조하였다. 상기 돌연변이체 마우스는 진 트랩 방법(gene trap method), 진 타겟팅 방법(gene targeting method), ENU(N-ethyl-N-nitrosourea) 처리법 등 당업계에서 사용되는 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 구체적으로 본 발명에서는 진 트랩 벡터를 사용하여 마우스의 게놈 DNA를 돌연변이시켰다. 상기 진 트랩 벡터로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 진 트랩 벡터

라면 제한없이 사용될 수 있으나, 보다 바람직하게는 VICTR20 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 VICTR20은 두 개의 기능 유닛(functional unit)인 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene;  $\beta$ geo/neo<sup>r</sup>)와 퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistant gene; puro)를 포함하고 있다(도 1 참조). 상기 네오마이신 저항성 유전자는 벡터가 삽입된 게놈 DNA의 상류 프로모터(upstream promoter)에 의해 발현되고, 상기 퓨로마이신 저항성 유전자는 벡터의 PGK 프로모터(phosphoglycerate kinase-1 promoter)에 의해 발현된다. 도 1에 도시된 바와 같이, 진 트랩 벡터 VICTR20은 양 끝에 LTR(long terminal repeats)이 있고, SA(splice acceptor),  $\beta$ geo/neo<sup>r</sup>(네오마이신 저항성 유전자), pA(poly-A sequence), PGK 프로모터, puro(퓨로마이신 저항성 유전자) 및 SD(splice donor)를 포함한다.

<34> 이후, 진 트랩 벡터의 삽입으로 인해 돌연변이가 유발된 게놈 DNA를 마우스의 배 줄기 세포(embryonic stem cell)에 도입하여 돌연변이체 라이브러리(mutant library)를 제작하였다. 이후, 상기 라이브러리로부터 돌연변이된 p43 유전자를 함유하고 있는 클론을 탐색하고, 이를 이용하여 이형접합성 돌연변이체 마우스(heterozygous mutant mice)를 제조하였다.

<35> 본 발명의 다른 실시예에서는 p43 돌연변이체 마우스 내 p43 대립 유전자(allele)의 염기서열을 분석한 결과, 진 트랩 벡터가 p43 유전자의 첫 번째 인트론 부위에 삽입되었음을 확인할 수 있었다(도 1 참조). 또한 써던 블롯과 PCR을 수행하여 p43 돌연변이를 확인하였으며(도 2 참조), p43의 발현에 대한 돌연변이의 효과를 노던 블롯(northern blot) 및 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인하였다(도 3 참조). 또한, 상기 이형접합성 돌연변이체 마우스를 교배한 결과, 야생형 16 마리, 이형접합성 돌연변이체 마우스 53 마리 및 동형접합성 돌연변이체 마우스(homozygous mutant mice) 28 마리를 얻을 수 있었다. 상기 비율(ratio)은 멘델의 분리의 법칙(Mendelian segregation)에 가까운 결과이며, 이는 돌연변이체 마우스가 배 발생단계

에서 치사되지 않음을 보여주는 결과이다. 또한, 흥미롭게도, 동형접합성 돌연변이체들은 야생형 마우스에 비해 몸체의 크기가 감소했음을 볼 수 있었다(미도시).

<36> p43이 면역 기작에 관계하고, 내피세포(endothelial cells)에서 작용한다고 보고된 바 있다(Chang S. Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:8388-8394, 2002; Park H-Y., *et al.*, *J. Leukocyte Biol.* 71:223-230, 2002; Ko Y-G., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:23028-23033, 2001). 본 발명자들은 p43이 상처 치유 과정(wound healing process)에서 일어나는 염증(inflammation) 및 혈관신생 과정에 관계할 것이라 예상하였다. 따라서, 본 발명자들은 이를 확인하기 위하여, 야생형 및 동형접합성 돌연변이체 마우스에 창상을 가한 후, 창상 치유 과정을 육안적 검사(gross examination)와 조직 검사(histological inspection)로 조사하였다. 그 결과, 돌연변이체 마우스(Ho)의 창상은 야생형 마우스(WT)에 비해 굉장히 느린 속도로 회복되고, 야생형 마우스의 창상 부위에 정제한 p43을 직접 처리한 경우, 창상 부위의 치유 과정이 촉진됨을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 또한 p43을 처리한 야생형 마우스(WT+p43)의 창상 부위에서 육아 조직(granulation tissue)의 증가 및 빠른 재상피화(re-epithelialization)를 관찰할 수 있었다(도 5 참조).

<37> 나아가, 대식세포/단핵세포(macrophage/monocyte)에 특이적인 항체를 이용하여 창상 부위를 면역염색(immunostaining)한 결과, p43을 처리한 야생형 마우스(WT+p43)의 창상부위 조직에서는 상기 세포들이 풍부하게 존재하는 반면, p43 돌연변이체(Ho)에서는 소수로 존재함을 확인할 수 있었다(도 6 참조). 이 때 상기 대식세포/단핵세포-특이적 항체로는 항-MOMA-2 항체를 사용할 수 있으며, 이

에 제한되는 것은 아니다. 또한 내피세포에 특이적인 항체를 이용하여 창상 부위 조직을 면역 염색한 결과, 혈관형성(vascularization) 또한 p43을 처리한 야생형 마우스(WT+p43)에서는 강화된 반면, p43 돌연변이체(Ho)에서는 반대 결과를 보임을 확인할 수 있었다(도 6 참조). 이 때 상기 내피세포-특이적 항체로는 항-CD31 항체를 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

<38> p43이 내피세포의 생성을 촉진하여 혈관형성을 유도한다는 것을 더욱 분명히 확인하기 위해, 본 발명자들은 혈관신생 과정에서 p43의 활성을 측정할 수 있는 여러 가지 다른 실험들을 수행하였다.

<39> 첫 번째로, 세포 내 창상 이동 분석(cellular wound migration assay)을 이용하여 p43이 내피세포의 이동을 유지할 수 있는지 조사하였다. 그 결과, p43을 처리했을 때 내피 세포의 이동이 강화됨을 확인할 수 있었다(도 7의 A 참조). 또한, 마트리젤(matrigel)을 이용하여 내피 세포를 p43 존재 하에서 배양한 결과, p43 처리시 혈관 형성(tube formation)이 자극됨을 확인할 수 있었다(도 7의 B 참조). 두 번째로, CAM 어세이(chorioallantoic membrane assay)를 수행하였다. p43이 로딩된 곳에서 혈관이 어트랙션(attraction)됨을 관찰할 수 있었다(도 7의 C 참조).

<40> 마지막으로, p43이 신혈관형성(neovascularization)에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, p43을 함유하는 마트리젤 플러그(matrigel plug)를 이용하여 조사하였다. 이 때 헤파린(heparin)과 여러 형태로 결합하여 혈관신생, 상피화 및 교원섬유(collagen fiber)의 침착을 촉진시키는 작용을 한다고 알려진 bFGF(basic

fibroblast growth factor)(Tsuboi, R. *et al.*, *J. Exp. Med.* 172:245, 1990; Kinsnorth, A. N. *et al.*, *Br. J. Surg.* 77:409, 1990)를 양성 대조구(positive control)로 사용하였다. 이후, 내피 세포에 특이적인 항체를 이용한 면역 염색을 통해서 겔 내에서 혈관 형성을 조사한 결과, bFGF와 p43을 포함하는 겔에서 신혈관형성이 매우 강화됨을 확인할 수 있었다(도 8 참조). 또한 대식세포/단핵세포에 특이적인 항체를 이용하여 면역 염색을 한 결과, 상기 내피세포의 면역 염색 결과와 일치함을 확인할 수 있었다(도 8 참조). 나아가, bFGF나 p43을 포함하는 겔은 대조구에 비해 더 높은 농도의 적혈구를 포함하고 있음을 확인할 수 있었다(도 8 및 도 9 참조).

<41> 본 발명에서 확인된 p43에 의한 창상 치유 촉진은 p43이 혈관신생뿐 아니라 염증(inflammation)에 대해 다중의 효과(multiple effect)를 나타내기 때문이라 생각된다. MCP-1(monocyte chemotactic protein 1), MIP-1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ )과 같은 여러 전 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 및 케모카인(chemokine)들이 p43에 의해 유도된다고 보고된 바 있기 때문에(Young-Gyu Ko, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:23028-23033, 2001), p43에 의한 대식세포/단핵세포의 유도는 예상과 일치하는 결과이다. 그러나, p43이 세포의 증식(proliferation)을 억제하고, 높은 농도에서 세포고사(apoptosis)를 유도한다는 이전 연구의 결과(Sun Young Chang, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:8388-8394, 2002)를 고려해 볼 때, 본 발명에서 확인된 p43의 전-혈관신생 활성(pro-angiogenic activity)은 놀라운 사실이다. 본 발명은 창상 회복에 관계된 혈관 생성에서 신규한 활성을 나타낸다는 것을 최초로 규명한 것이다.

<42> 본 발명에 따른 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물에는, 창상 치유의 효과를 더욱 강화시키기 위해, 테트라사이클린(tetracycline), 옥시테트라사이클린(oxytetracycline), 겐타마이신(gentamicin), 황산 네오마이신(neomycin sulfate), 바시트라신(bacitracin) 및 황산 폴리믹신 B(polymyxin B sulfate) 등의 항생제(antibiotics); 디펜히드라민(diphenhydramine), 프로메타딘, 트리페레나민, 페노티아진, 클로로페니라민, 안타졸린 및 판톨릴 등의 항히스티민제(anti-histamines); 항염제(anti-inflammatory drugs); 항바이러스제(anti-viral drugs); 항진균제(anti-fungal agents); PDGF(platelet-derived growth factor), PDAF, PDEGF, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), PF-4,  $\alpha$  FGF, bFGF(basic fibroblast growth factor), VEGF(vascular endothelial growth factor), GH(growth hormone), EGF(epidermal growth factor) 및 IGF(insulin-like growth factor) 등의 성장인자(growth factor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상이 추가로 포함될 수 있다.

<43> 또한 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 배합하여, 연고제(ointments), 파스타제(pastes), 파프제, 외용산제(external powders), 에어로솔제(aerosols), 좌제(suppository) 등의 외용제로 사용할 수 있으며, 특히 연고제 및 파스타제가 바람직하다. 상기 담체로는, 각 제형에 따라, 바세린, 유동 파라핀, 겔화 탄화수소 등의 탄화수소류; 중쇄 지방산트리글리세라이드, 돈지, 하드 팻트, 카카오지 등의 동식물성 오일; 세탄올, 스테아릴알코올, 스테아린산, 팔미틴산이소프로필 등의 고급지방산 알코올류; 지방산 및 이의 에스테르류; 폴리에틸렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세롤, 젤라틴, 백당, 당알코올 등의 수용성 기재; 글리세린 지방산 에스테르, 스테아린산폴리옥실, 폴리옥시에틸렌경화피마자유 등의 유화제; 아크릴산에스테르, 알긴산나트륨 등의 점착제 및 액화석유가스, 이산화탄소 등의 분



사제; 및 파라옥시벤조산에스테르류 등의 방부제 등이 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 함유하는 치료제는 이들을 사용하여 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다.

<44> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<45> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<46> <실시예 1>

<47> p43 돌연변이체 마우스의 제조

<48> 진 트랩 방법(Cecconi, F. & Meyer, B. I., *FEBS Lett.*, 480:63-71, 2000)을 이용하여 p43 구조유전자 내에 돌연변이가 유발된 마우스를 제조하였다. 먼저, 잠브로웁츠의 방법(Zambrowicz, B. P., *et al.*, *Nature* 392:608-611, 1998)에 따라 진 트랩 벡터 VICTR20(Lexicon Genetics, USA)을 사용하여 SvEvBrd 마우스(Lexicon Genetics, USA)의 게노믹 DNA를 돌연변이시켰다. 상기 돌연변이된 게노믹 DNA를 129/SvEvBrd 마우스(Omnibank)로부터 유래한 배 줄기세포에 도입시킨 후, 돌연변이체 라이브러리를 제작하였다. 상기 라이브러리에서 진 트랩 벡터의 도입에 의해 파괴된 p43 유전자를 함유하고 있는 클론을 스크리닝하였으며, 상기 클론을 'OST58507'이라 명명하였다. 이후, 상기 클론을 이용하여, 렉시콘 제네틱스(Lexicon Genetics)사의 권장방법에 따라 이형접합성(heterozygous) C57/BL6 마우스(Samtako)를 제조하였다. 이형접합성 마우스를 교배한 결과, 야생형 16 마리, 이형접합성 돌연변이체 마우스 53 마리 및 동형접합성 돌연변이체 마우스 28 마리가 생겼다. 이 비율(ratio)은 멘델

의 분리의 법칙에 가까운 결과이며, 이는 돌연변이체 마우스가 배 발생단계에서 치사하지 않음을 보여주는 것이다.

<49> <실시예 2>

<50> 돌연변이체 마우스에서 p43의 돌연변이 확인

<51> 2-1) p43 돌연변이체 대립 유전자 내에서 진 트랩 벡터가 삽입된 위치 확인

<52> p43 돌연변이체 대립 유전자(p43 mutant allele) 내에서 진 트랩 벡터가 삽입된 위치를 확인하기 위해 서열분석(sequencing)을 수행하였다. 이 때 서열분석은 염기서열 분석 회사인 판제노믹스(Pangenomics)에 의뢰하였다. 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, p43 유전자의 첫 번째 엑손(Exon I)과 두 번째 엑손(Exon II)은 약 7 kb 크기의 인트론에 의해 떨어져 있고, 진 트랩 벡터가 상기 첫 번째 엑손의 약 1.5 kb 하류(downstream)에 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.

<53> 2-2) 써던 블롯

<54> 먼저, 각 마우스 꼬리로부터 게노믹 DNA를 분리하여

*Nco*I 으로 절단한 후, 변성 겔 전기영동(denaturing gel electrophoresis)을 수행하여 절단된 DNA 절편들을 분리하였다. 이후, 탐침으로 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 유전자 트랩 벡터의 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene; *Neo<sup>r</sup>*)와 서열번호 3으로 표시되는, p43 유전자의 *Hind*III 절편을 사용하여 공지의 방법(southern, E. M., *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975)에 따라 써던 블롯을 실시하였다. 그 결과, 도 2의 A에 도시된 바와 같이, 동형 접합성 돌연변이체 마우스에서 진 트랩 벡터 내의 *Neo<sup>r</sup>* 유전자 및 돌연변이된 p43 유전자(7 kb)가 검출됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 야생형에서는 상기 *Neo<sup>r</sup>* 유전자는 검출되지 않았으며, 이형접합성 돌연변이체 마우스에서는 상기 *Neo<sup>r</sup>* 유전자가 약하게 검출되고, 온전한 p43 유전자(10 kb) 및 돌연변이된 p43 유전자(7 kb) 둘 다 검출되었다. 이 때 검출된 돌연변이된 p43 유전자(7 kb)의 크기가 온전한 p43 유전자(10 kb)의 크기보다 작은 이유는 진 트랩 벡터의 *Neo<sup>R</sup>* 유전자 내부에 *Nco*I 부위가 존재하여 절단되었기 때문이다. 상기 실험결과로부터 본 발명에서 제조한 p43 돌연변이체 마우스에서 p43 돌연변이가 생겼음을 알 수 있다.

#### <55> 2-3) PCR

<56> p43 유전자 내의 첫 번째 인트론을 포함하는 1 kb 크기의 DNA 단편을 증폭하기 위해, 게노믹 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 4로 표시되는 염기서열을 갖는 IF3 프라이머와 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 갖는 IR3 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 1 참조). 또한 진 트랩 벡터의 일부와 p43 유전자 일부를 포함하는 2.2 kb 크기의 DNA 단편을 증폭하기 위해, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 갖는 pKOF2 프라이머와 상기 IR3 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(도 1 참조). 이 때 PCR은 94℃에서 5분 동안 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 25회 반복 수행하였다. 그 결과, 도 2의 B에 도시

된 바와 같이, 야생형 마우스(+/-)에서는 1 kb의 크기의 밴드 하나만을 확인할 수 있었으며, 이형접합성 돌연변이체 마우스(+/-)에서는 1 kb 및 2.2 kb의 밴드 2개를 확인할 수 있었다. 반면, 동형접합성 돌연변이체 마우스(-/-)에서는 2.2 kb의 밴드 하나만을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명에서 제조한 돌연변이체 마우스에서 p43 유전자 내에 돌연변이가 생겼음을 알 수 있다.

<57> <실시예 3>

<58> p43 돌연변이체 마우스에서 p43의 발현 확인

<59> 3-1) 노던 블롯

<60> 먼저, 알엔에이지 미디 키트(RNeasy Midi Kit, QIAGEN)를 이용하여 제조사의 권장방법에 따라 마우스 배아 섬유아 세포(mouse embryo fibroblast; MEF)로부터 전체 RNA를 분리하였다. 이후, 변성 겔(denaturing gel)을 이용하여 상기 RNA들을 분리하였다. 상기 분리된 RNA들을 하이본드-N+ 막(Hybond-N+ membrane, Amersham)으로 옮긴 후, 서열번호 7로 표시되는 p43-특이적 탐침을 이용하여 혼성화시켰다. 그 결과, 도 3의 A에 도시된 바와 같이, 야생형(+/-) 및 이형접합성 돌연변이체 마우스에서는 p43 mRNA가 발현되었으나, 동형접합성 돌연변이체 마우스(-/-)에서는 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명에 따른 p43 돌연변이체 마우스(-/-)에서는 p43이 발현하지 않음을 나타내는 결과이다.

<61> 3-2) 웨스턴 블롯

<62> 지아크 등의 방법(Ziak, M, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:363-367, 2001)에 따라 마우스의 장기에서 단백질을 분리하였다. 이후, 박 등의 방법(Park S. G., *et al.*, *J. Biological Chemistry* 274:16673-16676, 1999)에 따라 항-p43 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그 결과, 도 3의 B에 도시된 바와 같이, 야생형(+/+) 및 이형접합성 돌연변이체 마우스에서는 p43이 발현되었으나, 동형접합성 돌연변이체 마우스(-/-)에서는 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 상기 노던 블롯 결과와 일치하는 것이다.

<63> <실시예 4>

<64> 창상 치유에 대한 p43의 촉진 효과 조사

<65> 4-1) 육안적 관찰(gross appearance)

<66> 웨너 등의 방법(Werner, S., *et al.*, *Science* 266:819-822, 1994)에 따라 7 내지 8 주령의 마우스(야생형 마우스 및 동형접합성 돌연변이체 마우스)의 등 부위의 피부(skin) 및 육상층 근육(*panniculus carnosus* muscle)을 제거하였다. 아베르틴(avertin) 마취 하에 등 부위의 털을 깎고, 70% 에탄올로 피부를 소독한 후, 원형(내경 1cm)의 펀치를 사용하여 등 부위 피부에 좌우 대칭의 원형 절제창(지름 0.5cm)을 만들었다. 창상 부위는 약을 바르거나 붕대를 감지 않고 방치하였다. 정제된 p43 4 $\mu$ g을 20% 글리세롤을 포함하는 PBS 완충용액 5 $\mu$ l에 용해시킨 후, 이를 25마리의 야생형 마우스의 창상 부위에 이틀 간격으로 4회 처리하였다. 이 때 상기 p43은 박 등의 방법(Park S. G., *et al.*, *J. Biological Chemistry* 274: 16673-16676, 1999)에 따라 대장균에서 정제한 것이다. 대조구로는 20% 글리세롤이 포함된 PBS 완충용액만을 처리하였다. 또한 p43 돌연변이체 마우스는 p43을 처리하지 않은 채 방치하였다. 이후,

시간에 따른 창상 치유 정도(wound closure)를 이미지-프로 소프트웨어(Image-Pro+ Plus software, Media Cybernetics)를 이용하여 매일 관찰하였다.

<67> 그 결과, 도 4의 A에 도시된 바와 같이, p43을 처리한 야생형 마우스(WT+p43)의 경우가 동형접합성 돌연변이체 마우스(Ho) 또는 p43을 처리하지 않은 야생형 마우스(WT)보다 시간이 경과할수록 창상 부위의 치유 과정이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 반면, 동형접합성 돌연변이체 마우스(Ho)의 경우에는 시간이 경과하여도 p43을 처리하지 않은 야생형 마우스(WT)에 비해 굉장히 느린 속도로 창상이 회복됨을 확인할 수 있었다. 또한, 창상 치유의 정도를 초기 창상 면적(wound area)에 대한 퍼센트(percentage)로 계산한 결과, 도 4의 B에 도시된 바와 같이, 시간이 경과할수록 p43을 처리한 야생형 마우스(WT+p43)의 경우 창상 면적이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다.

<68> 4-2) 조직 화학적 분석(histochemical analysis)

<69> 5일된 창상을 인접한 정상 조직 3 mm와 함께 분리한 후, 보우인스 용액(Bouin's solution, Sigma, HT10-1-32)에서 밤새도록 고정시킨 다음, 파라핀(paraffin)에 박아 넣었다. 이후, 파라포름알데히드로 고정된 파라핀 절편(paraformaldehyde-fixed paraffin section, 6  $\mu$ m)을 룬드 등의 방법(Lund, L. R., *et al.*, *EMBO J.* 18:4645-4656, 1999)에 따라 매슨 트리콤 염색(masson trichome staining)을 실시하였다. 이 때 대조구 마우스로는 동일한 성의 한 배 새끼(littermates)를 이용하였다.

<70> 그 결과, 도 5에 도시된 바와 같이, p43을 처리한 야생형 마우스의 경우(WT+p43), 육아 조직(상처 부위 아래 보라색 부분)과 상피층(advancing epithelial layer, 화살표 부분)이 많

이 자라나 빠르게 재상피화(re-epithelization)되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 동형접합성 돌연변이체 마우스의 경우(Ho)에는 상피층이 거의 자라지 않았음을 볼 수 있었다.

<71> 4-3) 대식세포/단핵세포 및 내피세포의 생성 정도 조사

<72> 5일된 창상을 인접한 정상 조직 3 mm와 함께 분리한 후, 분리된 창상부위 조직을 4% 파라포름알데히드 용액(4% paraformaldehyde in PBS)으로 고정시킨 후, OCT 컴파운드(OCT compound, Sakura)에 동결시켰다. 이후, 상기 창상부위 조직에서 대식세포/단핵세포 및 내피세포를 얼마나 생성되었는지 조사하기 위해, 상기 세포들에 특이적인 항-마우스 MOMA-2 항체(Sertotec) 1.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 항-CD31 항체(Pharminogen) 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 함께 각각 배양하였다. 1시간 동안 배양한 후, FITC-표지된 2차 항체 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 1시간 더 배양하였다. 이후, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  프로피디움 아이오디드(propidium iodide)로 염색한 다음, 슬라이드에 올려 놓고, 면역 형광 현미경(confocal immunofluorescence microscopy;  $\mu$ radiance; BioRad)으로 관찰하였다.

<73> 그 결과, 도 6에 도시된 바와 같이, p43을 처리한 야생형 마우스 조직(WT+p43)에서는 대식세포/단핵세포들이 풍부하게 존재하는 반면, 돌연변이체 마우스 조직(Ho)에서는 소수로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, 내피세포에 특이적인 항체를 이용하여 상처부위를 염색한 결과, 도 6에 도시된 바와 같이, p43 처리시 혈관형성(vascularization)이 강화된 반면, 돌연변이체에서는 반대의 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

<74> <실시예 5>

<75> 혈관신생에 있어서 p43의 효과

## &lt;76&gt; 5-1) 세포 내 창상 이동 분석(cellular wound migration assay)

<77> 세포 내 창상 이동 분석(cellular wound migration assay)을 이용하여 p43이 내피세포의 이동을 유도할 수 있는지 조사하였다. 먼저, 도살된 소로부터 대동맥을 절취하여 1% 페니실린(penicillin)과 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  펀기존(fungizone)을 포함하는 차가운 PBS 완충용액에 담가 세척하였다. 이후, 면도날을 사용하여 기도 대동맥의 표면으로부터 혈관내피세포(bovine aortic endothelial cells, BAECs)를 분리한 후, 20% FBS(fetal bovine serum)을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 배양된 배지를 면도칼로 2 mm의 너비로 자른 후, 자른 곳(injury line)을 표시했다. 그리고 나서, 상기 배지를 무혈청 액체 배지(serum-free medium)로 세척한 후, 1% 혈청(serum), 1 mM 티미딘(thymidine)과 1 nM의 p43을 포함하는 DMEM 배지에서 16시간 동안 배양한 다음, 세척하였다. 이 때 대조구는 p43을 처리하지 않았다. 이후, 상기 배지를 100% 메탄올(absolute methanol)로 고정시킨 다음, 기엠사(Giemsa, Chameleon Chemical)로 염색하였다.

<78> 그 결과, 도 7의 A에 도시된 바와 같이, p43을 처리한 경우 내피 세포의 이동이 강화됨을 확인할 수 있었다. 이는 p43이 내피 세포의 이동을 촉진한다는 것을 나타내는 결과이다.

## &lt;79&gt; 5-2) 혈관 형성(tube formation) 조사

<80> 상기 실시예 5-1)에서 p43이 내피세포의 이동을 유도함을 확인하였다. 이에 본 발명자들은 p43이 혈관형성을 유도하는지 조사하였다. 먼저, BAECs( $5 \times 10^5$  cells)를 1 nM의 p43이 첨가된 마트리젤(matrigel, Becton Dickinson)에서 37°C, 6시간 동안 배양하였다. 이 때 대조구



는 p43을 처리하지 않았다. 이후, 상기 BAECs의 세포 형태(cell morphology)의 변화를 위상차 현미경(phase contrast microscopy)으로 관찰하였다. 그 결과, 도 7의 B에 도시된 바와 같이, p43 처리한 경우 혈관 형성이 촉진됨을 볼 수 있었으나, 대조구에는 혈관 형성이 유도되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 p43이 혈관 형성을 촉진한다는 것을 나타내는 결과로서, 상기 실시예 5-1)의 결과와 일치하는 것이다.

<81> 5-3) CAM 어세이(chorioallantoic membrane assay)

<82> 수정된 계란(fertilized chick eggs)을 37℃ 에그 브리더(humidified egg breeder)에서 배양하였다. 배양 후 3일째 되는 날, 피하 주사용 바늘(18 gauge hypodermic needle)을 이용하여 에그 알부민 (egg albumin) 2 ml을 제거한 다음, 껍질(shell)로부터 용모막요막(chorioallantoic membrane; CAM)을 분리하였다. 6일 더 배양한 후, 0.1  $\mu$ g p43(20% 글리세롤을 포함하는 PBS 완충용액 10  $\mu$ l에 용해시킴)이 로딩된 써마녹스 커버슬립(thermanox coverslips; Nunc)을 상기 용모막요막 표면에 올려놓은 후, 혈관형성(vascularization)을 관찰하였다. 이 때 대조구는 p43을 처리하지 않았다. 그 결과, 도 7의 C에 도시된 바와 같이, p43이 로딩된 곳에서는 혈관이 어트랙션(attraction)됨을 관찰할 수 있었다.

<83> 5-4) 매트리지젤 플러그 어세이(matrigel plug assay)

<84> p43이 신혈관형성(neovascularization)을 촉진하는지 알아보기 위해, 마우스의 피부에 p43을 함유하는 매트리지젤 플러그를 주사한 후, 마슨 트리콤 염색(masson trichome staining)과 적혈구 세포의 카운팅(counting)을 수행하였다. 먼저, 0.25 ml 매트리지젤(Becton Dickinson)

에 1 ng/ml의 p43을 9 U/ml 헤파린과 함께 각각 첨가하여 혼합하였다. 이 때 음성 대조구로는 20% 글리세롤이 함유된 PBS 완충용액을 사용하였다. 또한 양성 대조구(positive control)로 헤파린과 여러 형태로 결합하여 혈관형성을 촉진하는 성장 인자로 알려진 bFGF(R&D systems)를 사용하였으며, 9 U/ml 헤파린과 함께 143 ng/ml의 bFGF를 첨가하여 사용하였다. 이후, 상기 혼합액을 7 주령의 C57BL/6 마우스(Samtako)에 0.25 ml/site의 농도로 피하주사하였다. 주사 후 7일 제 상기 마우스로부터 겔을 분리하여 4% 파라포름알데히드(parformaldehyde)로 24시간 동안 고정시켰다. 이후, 겔 플러그를 OCT 컴파운드(Sakura)에 박절한 다음, 시오-마이크로톰(cyo-microtome; Zeiss)을 이용하여 10  $\mu$ m 크기의 절편으로 세절하였다. 그리고 나서, 내피세포에 특이적인 항체인 항-CD31 항체(Pharminen) 및 대식세포/단핵세포에 특이적인 항체인 항-MOMA2 항체(Serotec)를 각각 반응시킨 후, 매슨 트리콤 염색(Lund, L. R., *et al.*, *EMBO J.* 18:4645-4656, 1999)을 실시하였다. 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, p43 처리한 경우에 신혈관형성이 매우 강화됨을 확인할 수 있었으며, 대식세포/단핵세포 또한 대조구에 비해 풍부하게 존재함을 확인할 수 있었다(녹색 형광). 또한, 흥미롭게도, 다른 세포들 또한 p43이 처리된 겔에서 풍부함을 확인할 수 있었다(빨강색 형광).

<85> 또한, 상기 겔 내에서의 혈관 형성(blood vessel formation)을 적혈구 세포 카운팅으로 조사한 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, bFGF나 p43을 포함하는 겔은 대조구에 비해 높은 농도의 적혈구 세포를 포함하고 있음을 확인할 수 있었다. 나아가, 겔 내의 헤모글로빈(Hb) 함량을 팟사니티 등의 방법(Passaniti, A., *et al.*, *Lab. Invest.*, 67:519-528, 1992)에 따라 측정한 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, bFGF나 p43을 포함하는 겔은 대조구에 비해 더 높은 농도의 헤모글로빈을 포함하고 있음을 확인할 수 있었다.

**【발명의 효과】**

<86>        이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 창상 치료용 약학적 조성물은 그 유효성분인 p43 단백질에 의한 대식세포/단핵세포 및 내피세포의 유도, 재생피화, 혈관형성 등과 같은 작용에 의하여 창상 치유에 탁월한 효과를 나타내기 때문에, 우수한 창상 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 p43을 유효성분으로 하는 창상 치료용 약학적 조성물.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 항생제(antibiotics), 항히스티민제(antihistamines), 항염제(anti-inflammatory drugs), 항바이러스제(anti-viral drugs), 항진균제(anti-fungal drugs) 및 성장 인자(growth factor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

**【청구항 3】**

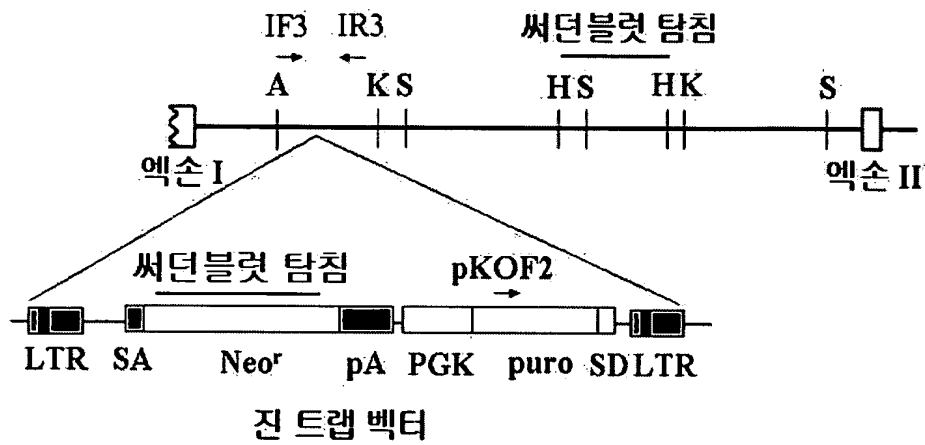
제 1항 또는 제 2항에 따른 약학적 조성물과 약학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함하는 외용제.

**【청구항 4】**

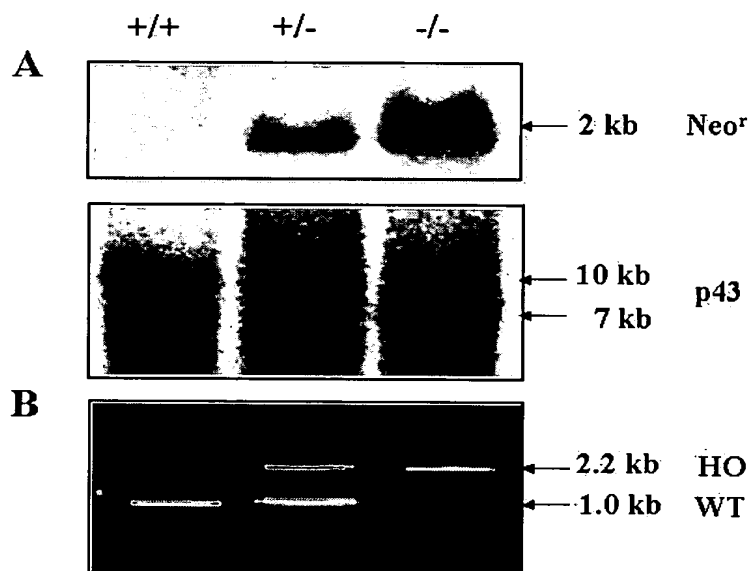
제 3항에 있어서, 연고제(ointments), 파스타제(pastes), 파프제, 외용산제(external powders), 에어로솔제(aerosols) 또는 좌제(suppositor)인 것을 특징으로 하는 외용제.

【도면】

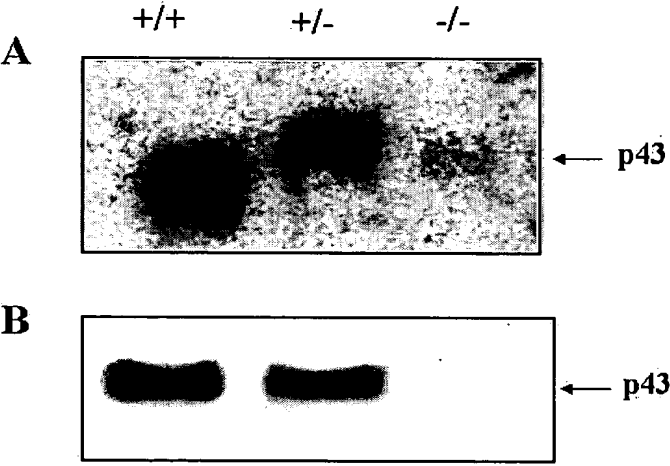
【도 1】



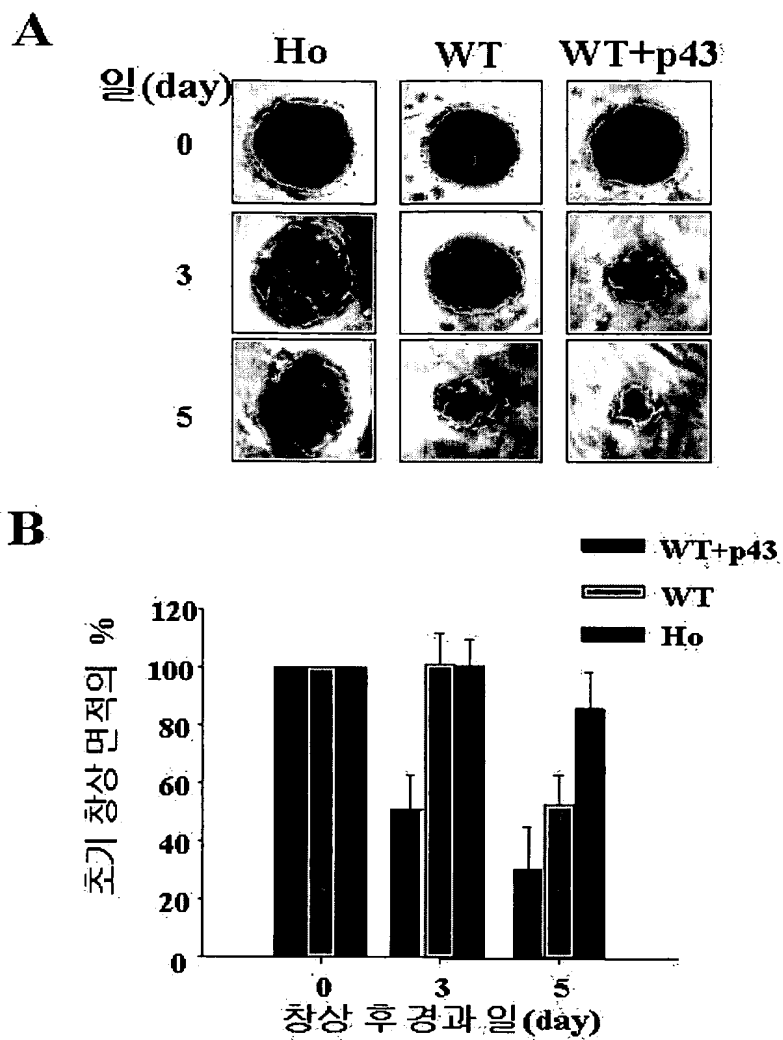
【도 2】



【도 3】



【도 4】

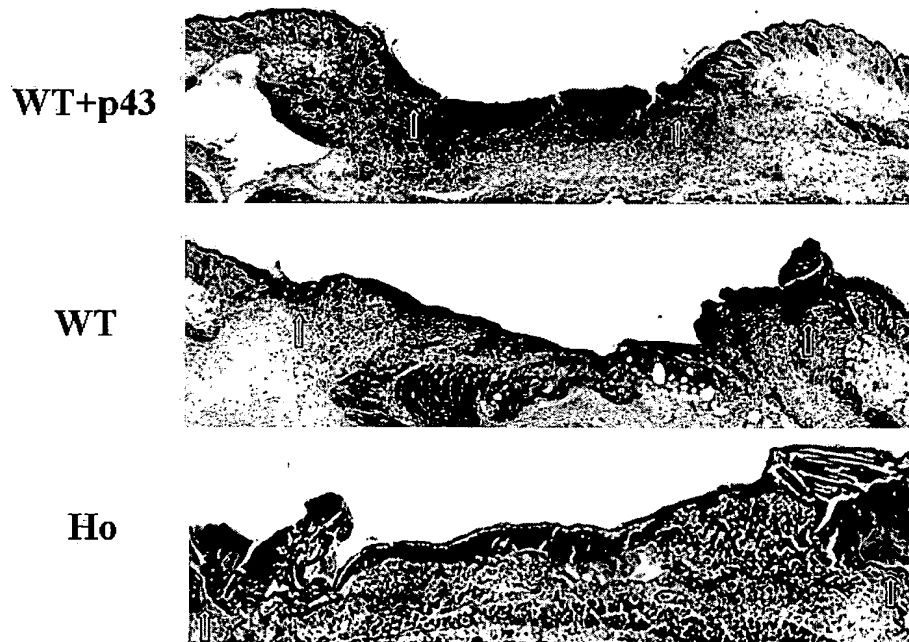




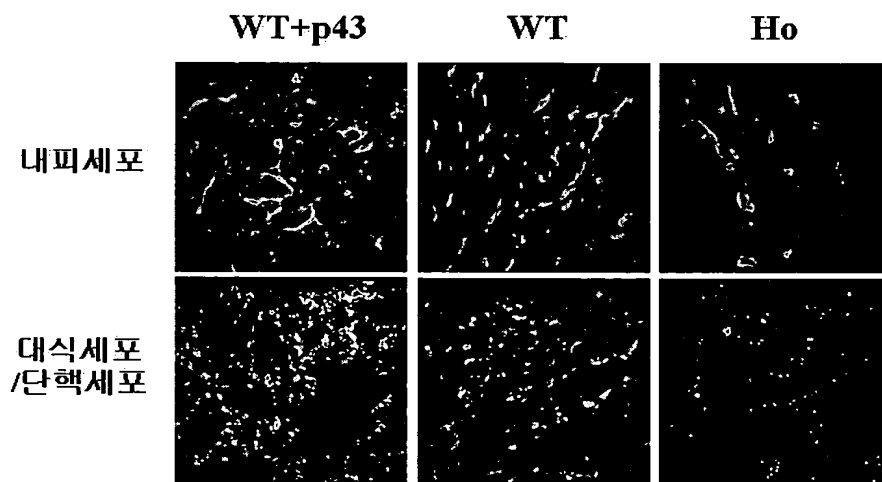
1020020042858

출력 일자: 2003/9/17

【도 5】

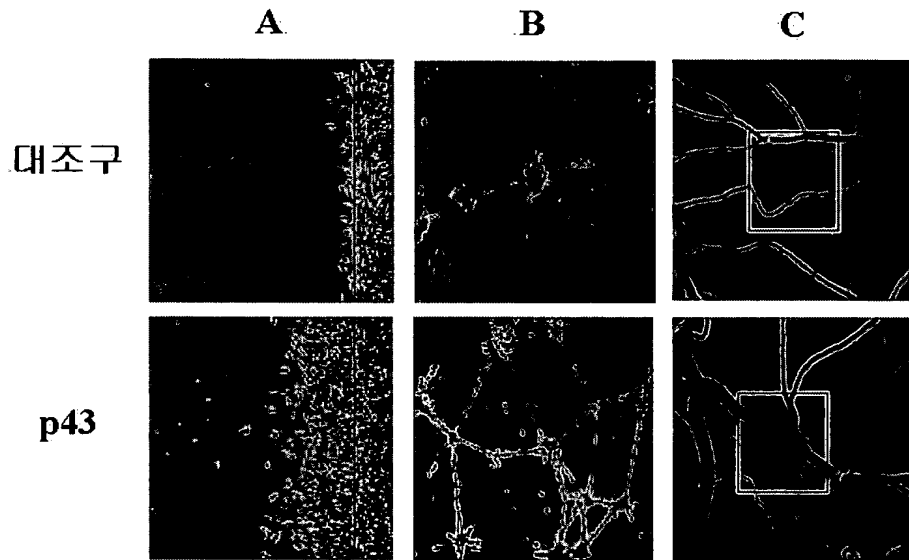


【도 6】

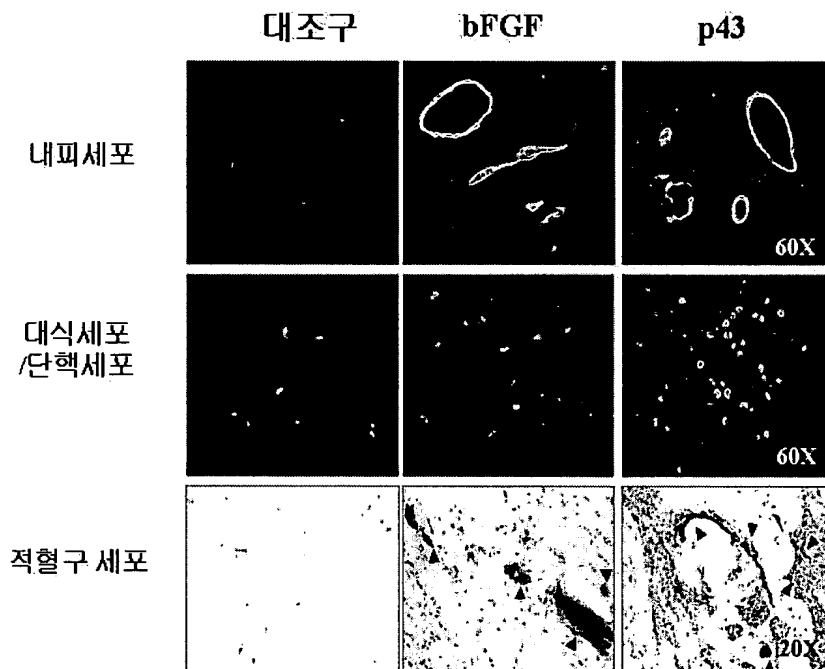




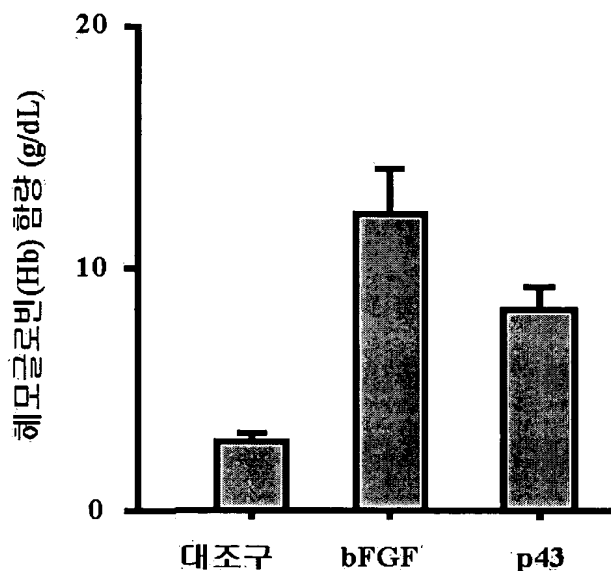
【도 7】



【도 8】



【도 9】



## 【서열목록】

<110> KIM, Sunghoon <120> Pharmaceutical composition for wound treatment  
 containing p43 as an effective component <130> NP02-1017 <160> 7 <170>  
 KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 312 <212> PRT <213> Homo sapiens <400>  
 1 Met Ala Asn Asn Asp Ala Val Leu Lys Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ala 1 5  
 10 15 Glu Ala Asp Gln Ile Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu  
 Leu 20 25 30 Lys Glu Lys Ala Ile Leu  
 Gln Ala Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys Leu 35 40  
 45 Arg Val Glu Asn Ala Lys Leu Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Gln 50  
 55 60 Glu Leu Ile Gln Ala Glu Ile Gln Asn Gly Val Lys Gln Ile Ala  
 Phe 65 70 75 80 Pro Ser Gly Thr  
 Pro Leu His Ala Asn Ser Met Val Ser Glu Asn Val

85                      90                      95   Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr Val Ser  
 Ser Gly Thr Lys Glu Gln                      100                      105                      110   Ile  
 Lys Gly Gly Thr Gly Asp Glu Lys Lys Ala Lys Glu Lys Ile Glu                      115  
 120                      125   Lys Lys Gly Glu Lys Lys Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ile Ala Gly  
 Ser            130                      135                      140   Ala Asp Ser Lys Pro Ile Asp Val  
 Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ile Gly 145                      150                      155  
 160   Cys Ile Ile Thr Ala Arg Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr Val  
 165                      170                      175   Glu Glu Val Asp Val Gly Glu Ile Ala Pro  
 Arg Thr Val Val Ser Gly                      180                      185                      190   Leu  
 Val Asn His Val Pro Leu Glu Gln Met Gln Asn Arg Met Val Ile                      195  
 200                      205   Leu Leu Cys Asn Leu Lys Pro Ala Lys Met Arg Gly Val Leu Ser  
 Gln            210                      215                      220   Ala Met Val Met Cys Ala Ser Ser  
 Pro Glu Lys Ile Glu Ile Leu Ala 225                      230                      235  
 240   Pro Pro Asn Gly Ser Val Pro Gly Asp Arg Ile Thr Phe Asp Ala Phe  
 245                      250                      255   Pro Gly Glu Pro Asp Lys Glu Leu Asn Pro  
 Lys Lys Lys Ile Trp Glu                      260                      265                      270   Gln  
 Ile Gln Pro Asp Leu His Thr Asn Asp Glu Cys Val Ala Thr Tyr                      275  
 280                      285   Lys Gly Val Pro Phe Glu Val Lys Gly Lys Gly Val Cys Arg Ala  
 Gln            290                      295                      300   Thr Met Ser Asn Ser Gly Ile Lys  
 305                      310            <210>            2 <211>            108 <212>            DNA <213>  
 Artificial Sequence <220> <223>            probe for Southern blot <400>            2 tgaatgaact

gcaggacgag gcagcgcggc tatggtggct ggccacgacg ggcgttcctt 60 gcgcagctgt

gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggac tggctgct 108 <210> 3 <211>

1226 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> probe for Southern blot

<400> 3 aagcttcgac catatgggag agctcccaac gcgttggatg catagcttga gttnnnnnnnn

60 nnnnnnnnnn nnnnnnnnng aattcaataa ggagactttt taaaaagata tttttatctt 120

aatgtgtgtg tgcctgcatt tgtgtgtatg caccattgcg tgcataccta gaggcctgcag 180

aggctagaag aggggttcaa cctggaactg aggctacagg tggttgttga gtatccacat 240

agatgctcgg aattaaacct gggttctcca gtccaagga gactaaatat tttcaaagta 300

agcctgcact ttgtactaca gtaaaataaa accactgtgg agtgactaat ataaaatagt 360

aagatgagct ctagattaac aggcaaaagt ttaagttttc agtattgtta aagtagcacc 420

atctccctaa agagaacat atttattttc cttccagtct tctgtgtttc cctcttttgt 480

ttgaaagttt agtgagtgtt tattttctct actgtgaaca caacatgaga caaactcagg 540

gattgtaaga gatcatggac ataaattact tttaggaacc tggcactcaa atgaaaatta 600

attagtaca agttggcatg gcattttatt attaaccctg ggtggnnnnn nnnnnnnnnn 660

nnntaaactg cgtggtgatg atttgtgatt gcaagaagac atagatatga agctctgaac 720

aacagtgtcc aggcaacatg tgaagaaaag gccctatgga ggggcaggag agcaggtagg 780

agcatcctaa tagaaattca gacagtgaag caagaagttg ttcacacagc ccacacagcc 840

tgtaagtgt tcttcactta aggtttgttg actgtaacca ctttttctaa agaaaacatt 900

aagaaaaaca taggtgtctg ttcgcttcct atttgctgct gtgattaaaa cgctgaccaa 960

aagcaacttg gctgaggagc cgtttttgta tttctccgtt taggtagcaa tgaagttgga 1020

gcaggaggaa gggtgcttac aggctagctc tcctgctctc cttgagcaag cattcttgtg 1080

gtagctcagg actccctgca cagtgacaca ccacgtgctt cttcaggggg acttcaaact 1140  
 actgtacacc ctttccttct gtcgaccata tgggagagct cccaacgcgt tggatgcata 1200  
 gcttgagtat tnnnnnnnnn nagctt 1226 <210>  
 4 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> IF3 primer  
 for PCR <400> 4 gaggacaatg tgctccataa acactcactg  
 30 <210> 5 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 IR3 primer for PCR <400> 5 cgttacttaa gctagcttgc cacctac  
 27 <210> 6 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 pKOF2 primer for PCR <400> 6 tgacatgggt gccagagaag gttctcaagg a  
 31 <210> 7 <211> 838 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 p43-specific probe for Northern blot <400> 7 ggtcaccgct tcatgtttct ctgccgattc  
 tggggaaaga tggcaacgaa tgatgctgtt 60 ctgaagaggc tggagcagaa ggggtgcagag  
 gcggatcaga tcatcgaata tctcaagcag 120 caggttgctc ttcttaagga gaaagcaatt  
 ttgcaggcaa caatgagaga agaaaagaaa 180 cttcgagttg aaaatgctaa actgaaaaaa  
 gaaatagaag agctaaagca agagctgatt 240 ctggcagaaa ttcataacgg agtggagcaa  
 gtgcgtgttc gattgagtac tccactgcag 300 acgaactgta ctgcttctga aagtgtggtg  
 cagtctccat cagtagcaac caccgcctct 360 cctgctacaa aagagcagat caaagcggga  
 gaagaaaaga aggtgaaaga gaagactgaa 420 aagaaaggag agaaaaagga gaagcagcag  
 tcggcagcag caagtactga ctccaagcct 480 atcgacgcat cgcgtctgga tcttgaatt  
 ggttgatttg ttactgcaa gaagcaccct 540 gatgcagatt cactgtatgt ggaggaagta  
 gatgtgggag aagcagcccc gcgcacggtc 600 gtcagcgggc tggatgaatca tgttcctcta

gaacagatgc aaaatcgtat ggtggtttta

660 ctctgtaatc tgaagcctgc aaagatgcgg

ggagttctgt ctcaagccat ggtgatgtgt

720 gccagttcac cagagaaagt ggagattctg

gcccctccca acgggtccgt tcctggggac

780 agaattactt ttgatgcttt tcctggagag

cctgacaagg agctaaaccc taagaaga

838